

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

T. Matsumoto

10/718, 729

Filed 11/24/2003

Q78586

20f2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2001年 8月 3日

出願番号 Application Number: 特願 2001-237180

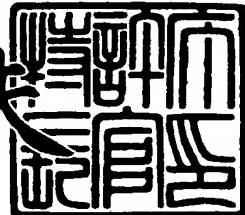
[ST. 10/C]: [JP 2001-237180]

出願人 Applicant(s): 日本電気株式会社

2004年 1月 21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 33703908
【提出日】 平成13年 8月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 27/327

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝5丁目7番1号 日本電気株式会社内
【氏名】 松本 達

【特許出願人】

【識別番号】 000004237
【氏名又は名称】 日本電気株式会社

【代理人】

【識別番号】 100110928

【弁理士】

【氏名又は名称】 速水 進治
【電話番号】 0422-23-7415

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 138392
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0110433

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素電極およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 絶縁基板上に設けられた電極部と、該電極部の上部に形成された固定化酵素層と、該固定化酵素層の上部に形成され、最表面に配置された制限透過層と、を有し、前記制限透過層は、フッ素含有ポリマーから主としてなり、前記制限透過層の表面に多数の溝が設けられたことを特徴とする酵素電極。

【請求項 2】 絶縁基板上に設けられた電極部と、該電極部の上部に形成された固定化酵素層と、該固定化酵素層の上部に形成され、最表面に配置された制限透過層と、を有し、前記制限透過層は、フッ素含有ポリマーから主としてなり、前記制限透過層の平均厚みが $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ であり、前記制限透過層の表面粗さが前記制限透過層の平均厚みの 0.0001 倍以上 1 倍以下であることを特徴とする酵素電極。

【請求項 3】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸 (A) のフルオロアルコールエステルであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の酵素電極。

【請求項 4】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸 (A) のフルオロアルコールエステルおよびポリカルボン酸 (B) のアルキルアルコールエステルを含むことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の酵素電極。

【請求項 5】 前記ポリカルボン酸 (B) が、ポリメタクリル酸、ポリアクリル酸、または、アクリル酸とメタクリル酸の共重合体であることを特徴とする請求項 4 に記載の酵素電極。

【請求項 6】 前記ポリカルボン酸 (A) が、ポリメタクリル酸、ポリアクリル酸、または、アクリル酸とメタクリル酸の共重合体であることを特徴とする請求項 3 乃至 5 いずれかに記載の酵素電極。

【請求項 7】 前記フッ素含有ポリマーは、アルキルアルコールエステル基およびフルオロアルコールエステル基を有するポリカルボン酸エステル化合物から主としてなることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の酵素電極。

【請求項 8】 前記制限透過層は、スピンドルコート法により形成された層であ

ることを特徴とする請求項1乃至7いずれかに記載の酵素電極。

【請求項9】 請求項1乃至8いずれかに記載の酵素電極を具備することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項10】 絶縁基板の正面に電極膜を形成した後、該電極膜をパターニングして複数の電極部を形成する工程と、

絶縁基板正面に酵素を含む液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて固定化酵素層を形成する工程と、

絶縁基板正面に、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンドント基が結合した構造を有するフッ素含有ポリマーを含む液をスピンドル法により塗布した後、絶縁基板を乾燥させて制限透過層を形成する工程と、絶縁基板をダイシングして複数の酵素電極を得る工程と、

を含むことを特徴とする酵素電極の製造方法。

【請求項11】 前記固定化酵素層を形成する工程の後、絶縁基板正面にシラン含有化合物を含む液を付着した後、絶縁基板を乾燥させて密着層を形成し、次いで該密着層の上面に前記フッ素含有ポリマー液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて前記制限透過層を形成することを特徴とする請求項10に記載の酵素電極の製造方法。

【請求項12】 前記シラン含有化合物は、シランカップリング剤であることを特徴とする請求項11に記載の酵素電極の製造方法。

【請求項13】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸（A）のフルオロアルコールエステルであることを特徴とする請求項10乃至12いずれかに記載の酵素電極の製造方法。

【請求項14】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸（A）のフルオロアルコールエステルおよびポリカルボン酸（B）のアルキルアルコールエステルを含むことを特徴とする請求項10乃至12いずれかに記載の酵素電極の製造方法。

【請求項15】 前記フッ素含有ポリマーは、アルキルアルコールエステル基およびフルオロアルコールエステル基を有するポリカルボン酸エステル化合物

から主としてなることを特徴とする請求項10乃至12いずれかに記載の酵素電極の製造方法。

【請求項16】 前記フッ素含有ポリマーを含む液は、フッ素含有化合物からなる溶媒を用いたことを特徴とする請求項10乃至15いずれかに記載の酵素電極の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、溶液中の特定の化学物質を、酵素反応を用いて電気化学的に測定する酵素電極およびそれを用いたバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】

生体試料等に含まれる各種成分の測定方法として、酵素反応と電気化学反応を組み合わせた測定方法が広く用いられている。たとえば、溶液中の化学物質を酵素の触媒機能により過酸化水素に変換し、この過酸化水素を酸化還元反応により計測するバイオセンサが汎用化している。グルコースバイオセンサの場合、グルコースをグルコースオキシターゼ (G O X) によって酸化し、グルコノラクトンと過酸化水素とする。発生する過酸化水素はグルコース濃度に比例することから、この過酸化水素の発生量を測定することによって試料中のグルコース量を定量する。酵素の触媒機能は、基質濃度に比例して働くが、基質濃度に限界がある。このため、限界濃度以上の基質濃度を測定する場合には、基質量を減らすため、固定化酵素層の上部に制限透過層を形成する方法が利用されていた。

【0003】

そのような制限透過層を形成した例として、米国特許5、696、314号には、テフロン粒子等を含む多孔質性の制限透過層を固定化酵素層の上に形成した酵素電極が開示されている。この酵素電極は、図10に示すように、基板30上に白金等からなる電極31が形成され、その上に固定化酵素層32が形成されている。そして、その上に接着層33を介して固定化酵素層32に含まれる酵素と同一の酵素を含む高分子層34が形成されている。さらにその上に、制限透過層

35、接着層36、保護層37が形成されている。制限透過層35は多孔質性であり、ポリマー粒子、金属粒子、およびポリマーバインダーを必須成分とし、ポリマー粒子およびポリマーバインダーの材料としてテフロンを用いた例が開示されている。制限透過層35はスクリーン印刷法を用いて形成される。すなわち、まずテフロンバインダーをフッ素含有溶剤に溶解させた後、アルミナ粒子、テフロン粒子等を混合し、これをインクに練り混む(roll milled)。作製したインクをスクリーン印刷(stenciled)することにより制限透過層35が形成される。

【0004】

しかしながら、テフロンのようなフッ素含有量の多いポリマーにより構成された制限透過層は、固定化酵素層等の隣接する高分子層との密着性に劣る。したがって、制限透過層を固定化酵素層等と一体化して形成したとしても、これらの層の界面の接着力は充分でない。その上、テフロンを用いた制限透過層は柔軟性に欠けるため、隣接する層が膨潤した場合、その膨潤に充分に追随することができない。したがって、使用中に、制限透過層と固定化酵素層等の隣接層との間で剥離が生じることがあった。

【0005】

また、上記公報に示されているテフロン等を用いた場合、溶剤に対する溶解性が充分でないため溶液の調整が困難である。このためスピンドル法等の技術により層形成することが難しく、制限透過層の薄層化が困難である。くわえて、上記フッ素化合物を用いた制限透過層は多孔質とすることによって制限透過性を発現させるものであるため、膜厚をある程度厚く確保する必要がある。上記米国特許公報には、10～40μmの厚みが好ましいと記載されている。以上のように、制限透過層が厚くせざるを得ないため、応答速度が遅く、また、洗浄に長時間を要するという課題を有していた。

【0006】

さらに、上述のようにテフロンを用いた制限透過層は柔軟性に欠けるため、隣接する層の膨潤により制限透過層が破損しやすく、この点でも改善の余地を有していた。特に、膨潤性の酵素固定化層に隣接して配置した場合、この問題が顕著

となる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、従来技術の有する上記課題を解決すべく、優れた制限透過層の開発に成功し、すでに特許出願している（特開平2000-81409号公報）。同公報開示の酵素電極は、特定構造のポリマーを主成分とする制限透過層を備え、広範囲の使用条件下において測定することが可能であり、長期使用に対して良好な耐久性を示す。

【0008】

その後、本発明者は、上記酵素電極を量産化するための検討を精力的に進めた。検討の結果、設計した性能スペックを満たす酵素電極を歩留まり良く作製するためには、製造上、様々な技術的課題をクリアしなくてはならないことが次第に明らかになってきた。一枚の基板から大量の酵素電極を作製するウエハプロセスにおいては、单一チップ単位で酵素電極を作製するプロセスと比べ、個々の酵素電極の性能差が大きくなる傾向にある。特開平2000-81409号公報記載の方法によれば、長期使用時における測定安定性に優れた酵素電極が得られるが、ウエハプロセスにおいて所望の性能を有する酵素電極を歩留まり良く得るためには、制限透過層について、材料以外の観点からの検討も重要となる。

【0009】

本発明はこうした背景のもとになされたものであり、広範囲の使用条件下において使用でき、長期使用に対する耐久性が良好で、しかも、生産性に優れた酵素電極を提供すること、特に大量生産プロセス（ウエハプロセス）を採用した場合にも所望の性能が安定的に得られる構造の酵素電極を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、ウエハプロセスにおいて歩留まり良く酵素電極を得る方法について鋭意検討した結果、制限透過層の表面形状を制御することにより、上記課題を解決できることを見いだし、本発明に到達した。

【0011】

本発明によれば、絶縁基板上に設けられた電極部と、該電極部の上部に形成された固定化酵素層と、該固定化酵素層の上部に形成され、最表面に配置された制限透過層と、を有し、前記制限透過層は、フッ素含有ポリマーから主としてなり、前記制限透過層の表面に多数の溝が設けられたことを特徴とする酵素電極、が提供される。

【0012】

また本発明によれば、絶縁基板上に設けられた電極部と、該電極部の上部に形成された固定化酵素層と、該固定化酵素層の上部に形成され、最表面に配置された制限透過層と、を有し、前記制限透過層は、フッ素含有ポリマーから主としてなり、前記制限透過層の平均厚みが $0.01\sim 1\mu\text{m}$ であり、前記制限透過層の表面粗さが前記制限透過層の平均厚みの 0.0001 倍以上 1 倍以下であることを特徴とする酵素電極、が提供される。

【0013】

本発明に係る酵素電極の制限透過層は、上記のように特定構造のポリマーにより構成されている。本発明は、このような条件を満たす制限透過層について、その表面形状を特定したものである。従来、制限透過層についての技術的検討は、主として構成材料や膜厚の設計等について行われ、これにより制限透過能力の向上等が図られてきた。これに対して本発明は、制限透過層の表面形状を従来にならない新規な構成のものとすることにより、酵素電極の長期測定安定性、測定精度および酵素電極生産時の歩留まりの向上を図っている。

【0014】

実施例にて後述するように、制限透過層表面に溝を設ける構成および制限透過層の表面粗さを規定した構成を採用することにより、酵素電極の長期測定安定性、測定精度および酵素電極生産時の歩留まりが向上する。この理由は必ずしも明らかではないが、上記構成を採用することにより、汚染物質の酵素電極表面への付着がある程度抑制されること、電極表面に付着した汚染物質が測定後の洗浄時により取り除かれやすくなっていること、所定の表面形状を備えることにより制限透過層の強度が向上することが性能向上に寄与しているものと推定される。

【0015】

表面に溝を設ける、あるいは、表面粗さを所定の範囲とすることによる性能向上の程度は、制限透過層の材料や厚み等によって大きく相違する。本発明のように厚みが薄く、かつ、上記特定構造のポリマーにより構成された制限透過層においては、性能向上の程度が顕著となる。

【0016】

制限透過層の表面に溝を設ける、あるいは、制限透過層の表面粗さを所定の範囲とするためには、ウエハ表面に固定化酵素層および制限透過層を含む多層膜を形成し、製膜終了後、チップ単位に切り出して酵素電極を得る方式を採用した上で、制限透過層の製膜法としてスピンドル法を採用し、さらにスピンドル条件を適切に設定することが有効である。

【0017】

また本発明によれば、絶縁基板の正面に電極膜を形成した後、該電極膜をパターニングして複数の電極部を形成する工程と、絶縁基板正面に酵素を含む液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて固定化酵素層を形成する工程と、絶縁基板正面に、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンドント基が結合した構造を有するフッ素含有ポリマーを含む液をスピンドル法により塗布した後、絶縁基板を乾燥させて制限透過層を形成する工程と、絶縁基板をダイシングして複数の酵素電極を得る工程と、を含むことを特徴とする酵素電極の製造方法が提供される。

【0018】

この製造方法によれば、特定構造のフッ素含有ポリマーを含む液をスピンドル法により塗布、乾燥して制限透過層を形成しているので、表面に溝が形成され、適度な表面粗さを有する制限透過層を安定的に形成することができる。

【0019】

この製造方法において、固定化酵素層を形成する工程の後、絶縁基板正面にシラン含有化合物を含む液を付着した後、絶縁基板を乾燥させて密着層を形成し、次いで該密着層の上面に前記フッ素含有ポリマー液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて前記制限透過層を形成する構成を採用することもできる。ここで、シラ

ン含有化合物としては、シランカップリング剤を用いることが好適である。特定構造のフッ素含有ポリマーと密着層を組み合わせることにより、制限透過層とその下地層（たとえば固定化酵素層）との間の密着性が顕著に向上升し、製造安定性に優れた高性能の酵素電極が得られる。

【0020】

本発明において、フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸（A）のフルオロアルコールエステルとすることができます。また、ポリカルボン酸（A）のフルオロアルコールエステルおよびポリカルボン酸（B）のアルキルアルコールエステルを含むものとすることができます。さらに、アルキルアルコールエステル基およびフルオロアルコールエステル基を有するポリカルボン酸エステル化合物から主としてなるものとすることができます。このようなポリマーを用いることにより、表面に溝が形成され、適度な表面粗さを有する制限透過層を、より安定的に形成することができる。

【0021】

本発明において、フッ素含有ポリマーを含む液は、フッ素含有化合物からなる溶媒を用いることができる。このようにすれば、表面に溝が形成され、適度な表面粗さを有する制限透過層を、より一層安定的に形成することができる。

【0022】

上記酵素電極の製造方法は、ウエハ単位で酵素電極を製造するものである。この点につき、従来のチップ単位で酵素電極を製造する方法と対比しながら、図13、図14を参照してプロセスの相違を明らかにする。チップ単位の製造では、まず基板に複数の電極部を形成した後、チップ単位で切り出す（図13（a））。スピナー表面に両面テープを貼り（図13（b））、次いで、切り出した電極部を配置したフレキシブル基板をスピナーに取り付ける（図13（c））。電極部に所定の溶液を滴下した後（図14（d））、スピナーを所定の回転数で回転させる（図14（e））。得られた酵素電極は、40℃、窒素雰囲気下の窒素ボックスに保管する（図14（f））。このようなチップごとの製造では、生産効率の向上に限界がある。そこで本発明では、基板上に複数の酵素電極を形成し、これを切り出すという方法を採用するとともに、このような方法によって良好な製

造安定性で酵素電極を形成するための手段として、上記特定構造のフッ素含有ポリマーを採用している。かかるフッ素含有ポリマーは、下地層に対する塗布性に優れる上、比較的低粘度の溶液または分散液として調製することができる。このため、たとえばスピンドル法により層形成することができる。そして、このような製造方法を採用することにより、表面に溝が形成され、適度な表面粗さを有する制限透過層が、歩留まり良く得られるのである。

【0023】

【発明の実施の形態】

（第1の実施の形態）

本発明の第1の実施の形態について図面を参照して説明する。本実施形態の酵素電極は、図1に示すように、絶縁基板1上に作用極として機能する電極2が設けられ、この上にγ-アミノプロピルトリエトキシシランから主としてなる結合層3が形成され、さらにその上に、有機高分子を母材として酵素を固定化した固定化酵素層4が形成され、そしてその上にポリカルボン酸樹脂のフルオロアルコールエステルを主成分とする制限透過層5が順次形成されている。制限透過層5の表面には、多数の溝が無秩序に形成されている。

【0024】

絶縁基板1の材料としては、セラミックス、ガラス、石英、プラスチック等の絶縁性の高い材料から主としてなるものを用いることができる。耐水性、耐熱性、耐薬品性および電極との密着性に優れた材料であることが好ましい。

【0025】

電極2の材料としては、たとえば白金、金、銀、炭素等を主成分とする材料が用いられ、このうち耐薬品性および過酸化水素の検出特性に優れた白金が好ましく用いられる。絶縁基板1上の電極2は、スパッタリング法、イオンプレーティング法、真空蒸着法、ケミカル・ベーパー・ディポジション法、電解法等により形成することができ、このうちスパッタリング法が望ましい。絶縁基板1との密着性が良好であり、かつ、白金層を容易に形成できるからである。また、絶縁基板1と電極2の密着性を改善するために、これらの間にチタン層やクロム層な

どを挟んでも良い。

【0026】

電極2上に形成された結合層3は、その上の固定化酵素層4と、絶縁基板1および電極2との密着性（結合力）を向上させる。また、絶縁基板1の表面のぬれ性を改善し、酵素を固定化した固定化酵素層4を形成する際の膜厚の均一性を向上させる効果もある。さらには、電極2での過酸化水素の反応に干渉するアスコルビン酸、尿酸およびアセトアミノフェンに対する選択透過性も有する。結合層3はシランカップリング剤を主成分とする。シランカップリング剤の種類としては、アミノシラン、ビニルシラン、エポキシシランが挙げられるが、このうち、密着性、選択透過性の観点から、アミノシランの一種であるγ-アミノプロピルトリエトキシシランが好ましく用いられる。結合層3は、例えばシランカップリング剤溶液をスピンドルコートすることにより形成することができる。この際、シランカップリング剤濃度は、たとえば0.1～2v/v%（体積%）程度とすることが好ましい。選択透過性が顕著に向上するからである。

【0027】

固定化酵素層4は、有機高分子を母材として、触媒機能をもつ酵素を固定化したものである。固定化酵素層4は、例えば、各種酵素、グルタルアルデヒド等のタンパク質架橋剤、およびアルブミンを含む溶液を、結合層3上に滴下し、スピンドルコート法にて形成される。アルブミンは、各種酵素を架橋剤の反応から保護するとともにタンパク質の基材となる。酵素としては、乳酸酸化酵素、グルコース酸化酵素、尿酸酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ラクトース酸化酵素、スクロース酸化酵素、エタノール酸化酵素、メタノール酸化酵素、スターチ酸化酵素、アミノ酸酸化酵素、モノアミン酸化酵素、コレステロール酸化酵素、コリン酸化酵素およびピルビン酸酸化酵素等、触媒反応の生成物として過酸化水素を生成する、または酸素を消費する酵素が挙げられる。

【0028】

ここで、2種類以上の酵素を同時に用いて過酸化水素を生成させてもよい。例えば、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、およびサルコシンオキシダーゼがこれに該当する。これらの酵素を用いることによってクレアチニンの検出が可能に

なる。また、酵素と補酵素を同時に用いてもよい。例えば、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素とニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）がこれに該当する。これらの酵素を用いることによって3-ヒドロキシ酪酸の検出が可能になる。さらに、酵素と電子メディエータを同時に用いてもよい。この場合は、酵素によって還元された電子メディエータが電極表面上で酸化され、このときに得られる酸化電流値を測定する。例えば、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムがこれに該当する。これらを用いることによってグルコースの検出が可能になる。

【0029】

以上述べたように、固定化酵素層4は、少なくとも酵素を含み、測定対象物質を電極感応物質である過酸化水素等に変換する機能を持つ構成であれば、特に限定されない。

【0030】

なお、固定化酵素層4の形成方法については、均一な膜厚を形成できる方法であれば特に制限がなく、スピンドルコート法以外にもスクリーン印刷法などを用いることもできる。

【0031】

制限透過層5は、タンパク質や尿素化合物等の汚染物質の付着を抑制する役割を果たす。これにより、長期使用した場合にも安定した出力特性が得られる上、良好な制限透過性が得られ、測定濃度範囲を大幅に拡大できる。たとえば本実施形態のセンサをグルコースセンサとして使用する場合、最表面の制限透過層5がグルコースの拡散速度を制限し、グルコース酸化酵素を使用した固定化酵素層4が拡散してきたグルコースと酸素で触媒反応して過酸化水素とグルコノラクトンを発生し、このうち過酸化水素が電極2に到達した際の酸化電流を測定してグルコースの濃度を知ることができる。測定時の電極系は、2極法の場合には外部から既存の参照極を使用し、3極法の場合は対極、参照極の両方を測定溶液中に同時に浸漬する。

【0032】

制限透過層5の表面は、次の(i)、(ii)のいずれかまたは両方を満たす構成と

する。

- (i) 制限透過層の表面に多数の溝が設けられた構成。
- (ii) 制限透過層の平均厚みが $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ であり、制限透過層の表面粗さが制限透過層の平均厚みの 0.0001 倍以上 1 倍以下、好ましくは 0.001 倍以上 1 倍以下である構成。

【0033】

このような構成とすることにより、広範囲の使用条件下において使用でき、長期使用に対する耐久性が良好で、しかも、生産性に優れた酵素電極を提供することができる。また、ウエハプロセスを採用した場合にも所望の性能が安定的に得られる構造の酵素電極を提供することができる。この理由は必ずしも明らかではないが、上記構成を採用することにより、汚染物質の酵素電極表面への付着がある程度抑制されること、所定の表面形状を備えることにより制限透過層の強度が向上することが性能向上に寄与しているものと推定される。

【0034】

上記溝のサイズは特に限定されないが、電子顕微鏡、特に三次元方向の解析能力の優れた原子間力顕微鏡で観察される程度のサイズを有することが好ましい。溝の深さは、好ましくは $0.1 \sim 100 \text{ nm}$ 、より好ましくは $0.5 \sim 30 \text{ nm}$ とする。

【0035】

制限透過層の表面に溝を設ける、あるいは、制限透過層の表面粗さを所定の範囲とするためには、ウエハ表面に固定化酵素層および制限透過層を含む多層膜を形成し、製膜終了後、チップ単位に切り出して酵素電極を得る方式を採用した上で、制限透過層の製膜法としてスピンドルコート法を採用し、さらにスピンドルコート条件を適切に設定することが有効である。たとえば、絶縁基板の正面に電極膜を形成した後、該電極膜をパターニングして複数の電極部を形成する工程と、絶縁基板正面に酵素を含む液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて固定化酵素層を形成する工程と、絶縁基板正面に、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンドント基が結合した構造を有するフッ素含有ポリマーを含む液をスピンドルコート法により塗布した後、絶縁基板を

乾燥させて制限透過層を形成する工程と、絶縁基板をダイシングして複数の酵素電極を得る工程と、を含むことを特徴とする酵素電極の製造方法、を採用することにより、上記特定表面構造の制限透過層を製造安定性良く得ることができる。

【0036】

スピンドル法の条件としては以下に述べるものが好ましい。すなわち、回転数については、好ましくは500 rpm以上、より好ましくは2000 rpm以上とする。上限については、たとえば6000 rpm以下とする。製膜時の温度は、0°C以上40°C以下、たとえば4°C程度の温度で製膜を行うのがよい。塗布材料は、制限透過層の形状に大きな影響を与えると考えられるが、この点については後述する。

【0037】

制限透過層5は、フッ素含有ポリマーにより構成される。好ましい構成材料としては、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンドント基が結合したポリマーが例示される。このようなポリマーを用いることにより、制限透過層表面をより確実に好適な形状に制御することができ、所望の溝や凹凸形状を実現することができる。この結果、酵素電極の測定安定性や製造時の歩留まりを向上させることができる。

【0038】

フッ素を含まないビニル系重合体は、炭素-炭素結合からなる主骨格を有する重合体であり、好ましい例としては、不飽和炭化水素、不飽和カルボン酸、および不飽和アルコールからなる群より選ばれた一種以上のモノマーの単独重合体または共重合体が挙げられる。このうち特にポリカルボン酸が好ましい。このような重合体を選択することによって、固定化酵素層等の他の有機高分子層との密着性が特に良好となり、耐久性に優れる制限透過層を得ることができる。また、ビニル系重合体に対し、フルオロアルキレンブロックがエステル基を介して結合していることが好ましい。エステル基は適度な極性を有しているため、固定化酵素層等の他の有機高分子層との密着性がより向上する。また、フルオロアルキレンブロックを含有するペンドント基とは、フルオロアルキレンを構成単位として含有するペンドント基をいう。フルオロアルキレンとは、アルキレン基の水素の一

部または全部をフッ素で置換したものをいう。

【0039】

制限透過層5の構成材料は、以上述べたポリマー材料により構成されるが、このうち、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルが特に好ましい。このような材料は、容易に所望濃度、所望粘度の溶液に調整できるため、スピンドル法により薄い厚みで製膜することが容易に実現できる。さらに、ポリマー自体が極性部分と非極性部分を含む特殊な分子構造を有するため、溶液塗布後の乾燥過程で、一部凝集が起こり、層表面に溝が生成し、適度な表面粗さの制限透過層が得られるものと考えられる。

【0040】

ポリカルボン酸の例としては、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸の共重合体等が挙げられる。ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルとは、ポリカルボン酸の一部、または全部がフルオロアルコールでエステル化されたものをいう。フルオロアルコールとはアルコール中の水素のすべて、または少なくとも一つがフッ素に置換されたものである。ポリカルボン酸のカルボキシル基はすべてがエステル化されていてもよいが、一部がエステル化されていればよい。均一な特性が得られる点で、0.1%以上がエステル化されていることが望ましい。ポリフルオロアルコール中の炭素数は、製膜後に優れた耐久性が得られる5から9の範囲が好ましく、製膜し易くなる8がさらに好ましい。また、ポリフルオロアルコールの級数は耐久性および耐薬品性が最も高くなる一級がよい。ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルのうち特に好ましいのは、ポリメタクリル酸1H、1H-パーフルオロオクチルおよびポリアクリル酸1H、1H、2H、2H-パーフルオロデシルである。優れた制限透過性が安定して得られる上、製膜し易く、酸アルカリおよび各種有機溶媒に対する耐性が高いからである。

【0041】

制限透過層の構成材料として、ポリカルボン酸のアルキルアルコールエステルを導入してもよい。たとえば、制限透過層を、ポリカルボン酸(A)のフルオロアルコールエステルと、ポリカルボン酸(B)のアルキルアルコールエステルと

を含む構成とすることができます、また、制限透過層を、アルキルアルコールエステル基およびフルオロアルコールエステル基を有するポリカルボン酸エステル化合物から主としてなる構成とすることもできる。なお、ポリカルボン酸（A）とポリカルボン酸（B）は、同種のものであっても異種のものであってもよい。また、「主としてなる」とは、上記ポリマーが制限透過層を構成する主成分となっていることをいい、たとえば、制限透過層に対する上記ポリマーの含有率が50重量%以上であることをいう。制限透過層を上記のような構成とすると、高温安定性の良好な酵素電極が得られる。なお、制限透過層を構成するポリマーの分子量は、好ましくは1000～50000、さらに好ましくは3000～30000とする。分子量が大きすぎると溶液の調整が困難となり、制限透過層の薄層化が困難となることがある。分子量が小さすぎると充分な制限透過性が得られない場合がある。なお、ここでいう分子量とは数平均分子量をいい、G P C (Gel Permeation Chromatography) により測定することができる。

【0042】

制限透過層は、上述したポリマーの溶液をスピンドルコート法により塗布することにより形成される。たとえばパーフルオロヘキサン等のパーフルオロカーボンの溶媒で希釈したポリメタクリル酸のポリフルオロアルコールエステル溶液を、触媒機能をもつ酵素を固定化した固定化酵素層4上に滴下してスピンドルコート法により形成することができる。この際、溶液中の濃度は、測定対象物質にもよるが、好ましくは0.1～5重量%、さらに好ましくは0.3重量%程度とする。この範囲とすることにより良好な制限透過性が発現するからである。

【0043】

（第2の実施形態）

次に、本発明の第2の実施の形態について図面を参照して説明する。本実施形態の酵素電極は、図2に示すように、絶縁基板1上に作用極として機能する電極2が設けられ、その上にγ-アミノプロピルトリエトキシシランから主としてなる結合層3が形成され、さらにその上に、有機高分子を母材として酵素を固定化した固定化酵素層4が形成され、その上にγ-アミノプロピルトリエトキシシランから主としてなる密着層6が形成され、そしてその上にポリカルボン酸樹脂の

フルオロアルコールエステルを主成分とする制限透過層5が順次形成されている。

【0044】

絶縁基板1上に形成する電極2、結合層3、固定化酵素層4、および制限透過層5は、第1の実施の形態と同様の方法により順次形成される。

【0045】

固定化酵素層4上に形成された密着層6は、固定化酵素層4とその上の制限透過層5との密着性を向上させる役割を果たす。基板をダイシングして複数の酵素電極を得るときや、ボンディングにより配線を行うとき、制限透過層5と下地層との間に剥離が発生したり、これらの層の破損が生じることがある。これに対し本実施形態の酵素電極では、シラン含有化合物を用いて密着層6を形成しているため、このような剥離を有効に防止することができる。この結果、特性の揃った酵素電極を安定的に製造することができる。また、制限透過層6を形成する際の膜厚の均一性や表面平坦性を向上させる効果もある。さらには、電極2での過酸化水素の反応に干渉するアスコルビン酸、尿酸およびアセトアミノフェンに対する選択透過性も良好となる。くわえて、密着層6を設けることにより、表面に溝が形成され、適度な表面粗さを有する制限透過層5を、より一層安定的に形成することができるという効果も得られる。

【0046】

密着層6は、たとえばシランカップリング剤により構成することができる。シランカップリング剤の種類としては、ビニルトリクロルシラン、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、 β -(3、4エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、 γ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、 N - β -(アミノエチル) γ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、 N - β -(アミノエチル) γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 N - β -(アミノエチル) γ -ア

ミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -クロロプロピルトリメトキシシラン、 γ -メルカプトプロピルトリメトキシシラン、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン、3-トリエトキシリル-N-(1、3-ジメチル-ブチリデン)、が挙げられる。このうち、密着性等の観点から、アミノシラン、特に γ -アミノプロピルトリエトキシシランが好ましく用いられる。また、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシランも効果的である。

【0047】

密着層におけるカップリング剤液等の塗布方法としては、スピンドル法、スプレー法、ディップ法、加熱気流法等が用いられる。スピンドル法とは、カップリング剤等、結合層の構成材料を溶解または分散させた液をスピンドルにより塗布する方法である。この方法によれば膜厚の薄い結合層を膜厚制御性良く形成することができる。また、スプレー法とはカップリング剤液等を基板に向けてスプレー噴霧する方法であり、ディップ法とは基板をカップリング剤液等に浸漬する方法である。これらの方法によれば、特殊な装置を必要とせず、簡便な工程で結合層を形成することができる。また加熱気流法とは、基板を加熱霧囲気下に設置し、ここにカップリング剤液等の蒸気を流動させる方法である。この方法によっても膜厚の薄い結合層を膜厚制御性良く形成することができる。

【0048】

このうち、シランカップリング剤溶液をスピンドルする方法が好ましく用いられる。優れた密着性が安定的に得られるからである。この際、溶液中のシランカップリング剤濃度は、好ましくは0.01~5 v/v%、より好ましくは0.05~1 v/v%とする。シランカップリング剤溶液の溶媒としては、純水；メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール；酢酸エチル等のエステル類等を単独または2種以上を混合して使用できる。このうち、純水で希釈したエタノール、メタノール、および酢酸エチルが好ましい。密着性の向上効果が特に顕著となるからである。なお、密着層6は、選択透過性を顕著に向上させ

る効果も有する。

【0049】

カップリング剤液等を塗布した後は、乾燥を行う。乾燥温度は特に制限がないが、通常、室温（25°C）～170°Cの範囲で行う。乾燥時間は、温度にもよるが、通常は0.5～24時間とする。乾燥は空气中で行っても良いが、窒素等の不活性ガス中で乾燥させてもよい。たとえば、窒素を基板に吹き付けながら乾燥させる窒素ブロー法を用いることもできる。

【0050】

（第3の実施形態）

本発明に係る酵素電極を具備するバイオセンサの構造を図12に示す。このセンサは、絶縁基板1上に作用極17、対極18および参照極19が配置され、さらに、温度センサ15が設けられている。作用極17、対極18および参照極19の表面は、それぞれ図1に示した層構造の多層膜で覆われている。

【0051】

本実施形態では作用極は一種類であるが、異なる固定化酵素層を形成した複数の作用極を設けた構成とすることもできる。また、温度センサ以外に、pHセンサ等を設けた構成とすることもできる。また、作用極17、対極18および参照極19は、任意の配置とすることができる。また、本実施形態では作用極、対極、参照極の3極からなるバイオセンサについて説明したが、白金からなる作用極と参照極を石英基板上に設けた構成としてもよい。

【0052】

また、本実施形態ではアンペロメトリックタイプのセンサの例を示したが、本発明の酵素電極は、イオン感受性電界効果型トランジスタタイプのセンサにも適用できることはいうまでもない。

【0053】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。なお、実施例で用いたポリメタクリル酸1H、1H-パーフルオロオクチルは、住友スリーエム社製のフローラードFC-722であり、平均分子量Mnは6000～8000程度（GPC測定

値) である。

【0054】

(実施例1)

日本電気硝子(株)社製の4インチの石英ウエハ(厚さ0.515mm)を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0055】

まず、白金からなる作用極(面積5mm²)と対極(面積5mm²)、銀／塩化銀からなる参照極(面積1mm²)を一組とした87組の電極チップをウエハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウエハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10mm×6mmとなる。

【0056】

つづいて1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン(以下、適宜「APTES」と称する。)水溶液をスピンドルコートして結合層を形成した。次に、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピンドルコートして、固定化酵素層を形成した。

【0057】

次に、固定化酵素層上に、パーフルオロヘキサンを用いて0.3重量%に調整したポリメタクリル酸1H,1H-パーフルオロオクチル溶液を塗布して制限透過層を形成する。一方のウエハに対しては以下の条件でスピンドルコート法により塗布した。これを試料1とする。

スピンドルコート回転数：3000 rpm

滴下する溶液量：0.3μl/mm²

製膜温度：4°C

他方のウエハに対しては、ディップコート法により塗布を行った。これを試料2とする。

【0058】

最後に、ガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、制限透過層材料の塗布方法の異なる2種類の酵素電極が得られた。これらについて、制限透過層の層

厚、表面粗さを測定するとともに、電極表面を原子間力顕微鏡により表面粗さを測定した。結果は以下のようになった。

試料1（スピンドルコート）

平均層厚D：0.3 μ m 表面粗さR：0.6 nm R/D=0.002

試料2（ディップコート） 平均層厚D：1.4 μ m 表面粗さR：1.3 nm
R/D=0.009

表面粗さは、中央値（R₅₀）である。

【0059】

スピンドルコート法により形成した試料1については、制限透過層表面に溝が形成される。図7はその様子を示す表面AFM（AFM：Atomic Force Microscopy 原子間力顕微鏡）像である。なお、図8は、図7に対応する制限透過層の表面粗さ測定図を示す。溝の深さは、0.1～100 nmの範囲にあった。

【0060】

（実施例2）

日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウェハ（厚さ0.515 mm）を用意し、以下の工程を実施した。

【0061】

まず、白金からなる作用極（面積5 mm²）と対極（面積5 mm²）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1 mm²）を一組とした87組の電極チップをウェハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウェハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10 mm×6 mmとなる。

【0062】

つづいて、全面に1v/v%の γ -アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピンドルコートして結合層を形成した。その後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピンドルコートして、固定化酵素層を形成した。

【0063】

その後、固定化酵素層の上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて0.3重

量%に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピンドルコートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。スピンドルコートの条件は3000 rpm、30秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸1H、1H、2H、2H-フルオロデシルのキシレンヘキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率17%、キシレンヘキサフルオライド含有率83%、粘度20 cps (25°C)）に対し、さらにキシレンヘキサフルオライドを添加し樹脂含有量を0.3重量%に調整したものを用いた。

【0064】

制限透過層の層厚、表面粗さは以下の通りであった。

平均層厚D: 0.3 μm 表面粗さR: 0.6 nm R/D = 0.002

その後、ガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。これについて、制限透過層表面をAFMにより観察をした結果を図9に示す。図中、白い部分が、制限透過層に形成された溝を示す。制限透過層表面に多数の溝が無秩序に形成されていることがわかる。

【0065】

(実施例3)

日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウエハ（厚さ0.515 mm）を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0066】

まず、白金からなる作用極（面積5 mm²）と対極（面積5 mm²）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1 mm²）を一組とした87組の電極チップをウエハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウエハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10 mm × 6 mmとなる。

【0067】

つづいて、全面に1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピンドルコートして結合層を形成した。その後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピンドルコートして、固定化酵素層を形成した。

【0068】

その後、固定化酵素層の上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて0.3重量%に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピンドルコートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。以上により第1の酵素電極を作製した。スピンドルコートの条件は3000 rpm、30秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸1H、1H、2H、2H-パーフルオロデシルのキシレンヘキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率17%、キシレンヘキサフルオライド含有率83%、粘度20 cps (25°C)）に対し、さらにキシレンヘキサフルオライドを添加し樹脂含有量を0.3重量%に調整したものを用いた。

【0069】

対照として、アクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルを固定化酵素層上にディップコートして制限透過層を形成し、第2の酵素電極を作製した。

【0070】

第1および第2の酵素電極は、それぞれのウェハから4個ずつ取り、評価に供した。なお、制限透過層の平均厚みは、第1の酵素電極は0.08 μm、第2の酵素電極は1.6 μmであった。第1の酵素電極の制限透過層のプロファイルは以下の通りであった。

平均層厚D: 0.08 μm 表面粗さR: 0.6 nm R/D = 0.0075

各電極をワイヤーボンディングによって電気化学測定装置に接続し、印加後に得られるベースの電流値から、出力の電流値の差をセンサ出力として測定した。印加電位は、参照極に対して作用極に700mVとした。測定中および保存中は各酵素電極を150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に24°Cで浸漬するものとした。

【0071】

第1の酵素電極（スピンドルコート法）のグルコースに対するセンサ出力（検量線）を図3に示す。また、第2の酵素電極（ディップコート法）のグルコースに対するセンサ出力（検量線）を図4に示す。スピンドルコート法により作製した酵素電極では直線性の高いセンサ出力が得られ、かつセンサ間のばらつきもほとんど発

生しなかった。制限透過層をスピンドルコート法で製作することによって形成された溝が、グルコースを固定化酵素層へスムーズに透過させていることによるものと考えられる。一方、ディップコート法で作製した場合、直線性が低下し、さらにセンサ間のばらつきが大きくなつた。ディップコートで製作された場合には、溝が形成されないため、グルコースの透過がスムーズに行われないばかりか、透過率のばらつきが大きくなり、また、ウエハ面内で作製される個々の酵素電極の性能のばらつきが大きくなることが原因と考えられる。

【0072】

以上のように、制限透過層をスピンドルコート法で製作し表面に溝を形成された酵素電極は、得られる検量線の直線性が高く、センサ間のばらつきの低い優れた特性を示すことが明らかになった。

【0073】

(実施例4)

日本電気硝子(株)社製の4インチの石英ウエハ(厚さ0.515mm)を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0074】

まず、白金からなる作用極(面積5mm²)と対極(面積5mm²)、銀／塩化銀からなる参照極(面積1mm²)を一組とした87組の電極チップをウエハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウエハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10mm×6mmとなる。

【0075】

つづいて、全面に1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピンドルコートして結合層を形成した。その後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピンドルコートして、固定化酵素層を形成した。そしてその後、1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピンドルコートして結合層を形成した。

【0076】

その後、固定化酵素層の上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて0.3重

量%に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピンドルコートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。以上により第1の酵素電極を作製した。スピンドルコートの条件は3000 rpm、30秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸1H、1H、2H、2H-パーフルオロデシルのキシレンへキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率17%、キシレンへキサフルオライド含有率83%、粘度20 cps (25°C)）に対して、さらにキシレンへキサフルオライドを添加し樹脂含有量を0.3重量%に調整したものを用いた。

【0077】

対照として、アクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルを固定化酵素層上にディップコートして制限透過層を形成し、第2の酵素電極を作製した。

【0078】

第1および第2の酵素電極は、それぞれのウェハから3個ずつ取り、評価に供した。

【0079】

第1の酵素電極の制限透過層のプロファイルは以下の通りであった。

平均層厚D: 0.08 μm 表面粗さR: 0.6 nm R/D = 0.0075

各電極をワイヤーボンディングによって、電気化学測定装置に接続し、印加後に得られるベースの電流値から、出力の電流値の差をセンサ出力として測定した。印加電位は、参照極に対して作用極に700mVとした。測定中および保存中は各酵素電極を150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に24°Cで浸漬するものとした。

【0080】

第1および第2の酵素電極のグルコースに対するセンサ出力の安定性を図5および図6にそれぞれ示した。あらかじめ、出力が揃った酵素電極を選んでおき、初日、1、3、9、27日に300 mg/dlグルコースに対するセンサ出力を測定した。その結果、スピンドルコート法で製作することによって、27日間、ほとんどセンサ出力が変動せず、安定していた結果が得られた。しかしながら、ディップコート法で製作した場合、センサ出力が大きく増加し、ほとんど安定性が得

られなかった。また、増加の程度も個々のセンサ間で異なっていた。制限透過層をスピンドルコート法で作製した酵素電極は、制限透過層表面に多数の溝が形成され、適度な表面粗さが付与されているため、汚染物質の付着が抑制され、これにより、測定値の安定性が向上しているものと考えられる。

【0081】

(実施例5)

日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウェハ（厚さ0.515mm）を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0082】

まず、白金からなる作用極（面積5mm²）と対極（面積5mm²）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1mm²）を一組とした87組の電極チップをウェハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウェハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10mm×6mmとなる。

【0083】

つづいて、全面に1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピンドルコートして結合層を形成した。つづいて、5w/v%のパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂溶液をスピンドルコートしてパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂（ナフイオン）を主成分とするイオン交換樹脂層を形成した。その後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピンドルコートして、固定化酵素層を形成した。そしてその後、1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピンドルコートして結合層を形成した。

【0084】

その後、その上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて0.3重量%に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピンドルコートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。以上により第1の酵素電極を作製した。スピンドルコートの条件は3000rpm、30秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸1H、1H、2H、2H-パーフルオロデシルのキシレンヘキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率17%、キシレンヘキサフルオライド含有率

83%、粘度20cps(25℃)）に対し、さらにキシレンヘキサフルオライドを添加し樹脂含有量を0.3重量%に調整したものを用いた。

【0085】

対照として、アクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルを固定化酵素層上にディップコートして制限透過層を形成し、第2の酵素電極を作製した。

【0086】

第1および第2の酵素電極は、それぞれのウエハから3個ずつ取り、評価に供した。なお、制限透過層の平均厚みは、第1の酵素電極は0.2μm、第2の酵素電極は1.4μmであった。また、第1の酵素電極の制限透過層のプロファイルは以下の通りであった。

平均層厚D：0.2μm 表面粗さR：0.5nm R/D=0.0025

各電極をワイヤーボンディングによって電気化学測定装置に接続し、印加後に得られるベースの電流値から、出力の電流値の差をセンサ出力として測定した。印加電位は、参照極に対して作用極に700mVとした。測定中および保存中は各酵素電極を150mMの塩化ナトリウムを含むpH7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に24℃で浸漬するものとした。

【0087】

第1の酵素電極（スピンドル法）を用いて糖尿病患者の実尿（22サンプル）を測定し、同時に既存の測定装置である臨床検査装置（商品名、日立自動測定装置7050）でも同一条件で測定した。そして得られた個々の成分の値を回帰処理し、相関関係を算出して評価した。また、第2の酵素電極（ディップコート法）を用いて同様に糖尿病患者の実尿を測定した。これらの結果を表1に示す。スピンドル法により作製した酵素電極ではすべての電極で相関係数0.99以上の高い相関が得られたのに対して、ディップコート法で作製した場合、相関係数のばらつきが認められ、いずれも0.89以下であった。スピンドル法で製作されることによって、均一に溝が形成され、グルコースがスムーズに制限透過層を透過し、適度な表面粗さが付与されているため、汚染物質の付着が抑制され、ウエハ面内で作製される個々の酵素電極の性能が均一になると考えられる。

以上のように、制限透過層をスピンドルコート法で製作し表面に溝を形成された酵素電極は、臨床検査用の大型装置と同等の高い測定精度を示すことが明らかになった。

【0088】

【表1】

表1

第1の酵素電極

センサ1-1	R=0.990
センサ1-2	R=0.997
センサ1-3	R=0.994

第2の酵素電極

センサ2-1	R=0.890
センサ2-2	R=0.789
センサ2-3	R=0.819

【0089】

(実施例6)

日本電気硝子(株)社製の4インチの石英ウェハ(厚さ0.515mm)を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0090】

まず、白金からなる作用極(面積5mm²)と対極(面積5mm²)、銀／塩化銀からなる参照極(面積1mm²)を一組とした87組の電極チップをウェハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウェハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10mm×6mmとなる。

【0091】

つづいて、全面に1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピニコートして結合層を形成した。その後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピニコートして、固定化酵素層を形成した。そしてその後、1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピニコートして結合層を形成した。

【0092】

その後、固定化酵素層の上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて0.3重量%に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピニコートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。以上により第1の酵素電極を作製した。スピニコートの条件は3000rpm、30秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルのキシレンヘキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率17%、キシレンヘキサフルオライド含有率83%、粘度20cps(25℃)）に対して、さらにキシレンヘキサフルオライドを添加し樹脂含有量を0.3重量%に調整したものを用いた。

【0093】

対照として、アクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルを固定化酵素層上にディップコートして制限透過層を形成し、第2の酵素電極を作製した。

第1の酵素電極の制限透過層のプロファイルは以下の通りであった。

平均層厚D: 0.3μm 表面粗さR: 0.5nm R/D = 0.0017

第1および第2の酵素電極のすべてをワイヤーボンディングによって、電気化学測定装置に個々に接続し、印加後に得られるベースの電流値から、出力の電流値の差をセンサ出力として測定した。印加電位は、参照極に対して作用極に700mVとした。測定中および保存中は各酵素電極を150mMの塩化ナトリウムを含むpH7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルфонニックアシッド）緩衝液中に24℃で浸漬し、この緩衝液を含む0から2000mg/dlグルコース溶液に対するセンサ出力である電流値を測定し検量線を作成した。そして、良品の酵素電極を選択し、歩留まりを以下の計算式に基づいて算出した。

計算式： 歩留まり (%) = 良品／合計×100

ただし、良品の酵素電極とは、2000 mg/dlグルコースに対する出力が30 nA以上150 nA未満、検量線の直線性については、500mg/dlでの出力が2000mg/dlでの出力の1/4±30%以内のものとした。

【0094】

表2に第1の酵素電極のセンサ出力、表3に第2の酵素電極のセンサ出力をそれぞれ示す。表中のアルファベットおよび数字の組み合わせは基板面内の位置を示す。たとえば、「A」と「3」の組み合わせの示す位置のセンサ出力は、「6 1. 1」である。そして、第1の酵素電極ウエハの歩留まりは約82%（71/87）、第2の酵素電極ウエハの歩留まりは約11%（10/87）であった。以上の結果から、大量生産プロセスにおいて、溝が形成されることが有効であることが示された。

【0095】

【表2】

表2

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	27.6	37.6	38.0	71.0	52.0	30.5	44.1	0.8
2	27.3	52.1	15.6	97.0	72.0	43.0	103.0	127.0
3	61.1	46.6	67.1	91.0	60.2	45.2	45.1	34.9
4	20.4	55.2	45.4	39.9	58.2	91.1	68.9	142.9
5	79.3	65.0	42.0	71.0	32.0	120.0	44.2	26.4
6		9.8	78.1	81.0	43.0	48.0	81.0	39.7
7		49.1	62.7	50.0	63.0	48.3	54.1	92.0
8		151.2	129.3	70.0	37.1	52.0	70.0	26.5
9		14.3	59.0	32.1	53.0	79.0	77.1	21.5
10			19.8	52.4	79.0	30.6	143.5	
11			25.7	44.0	50.0	41.9	0.0	
12			129.0	44.0	33.0	49.0	27.0	
13				37.3	58.4	1.9		
14					55.0			

【0096】

【表3】

表3

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	6.2	6.3	8.3	7.2	2.0	5.5	4.9	0.0
2	3.2	2.5	1.6	9.9	2.1	4.9	5.0	7.0
3	2.9	0.0	8.7	1.9	32.1	52.2	4.2	4.4
4	7.3	5.8	449.0	179.0	5.1	11.9	0.9	661.0
5	99.3	15.0	6.4	0.5	2.1	221.0	2.9	1.4
6		974.0	7.1	80.0	0.0	4.7	1.8	7.7
7		914.0	7.0	8.1	6.1	8.4	5.5	9.1
8		1.1	291.0	92.1	7.4	5.8	3.1	62.5
9		1.9	9.8	1.1	33.0	97.0	17.0	4.0
10			19.8	25.4	97.0	6.1	131.0	
11			7.1	23.0	12.0	9.7	4.4	
12			21.0	44.3	7.3	11.9	9.9	
13				0.0	1.9	2.3		
14					0.9			

【0097】

(実施例7)

日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウェハ（厚さ0.515 mm）を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0098】

まず、白金からなる作用極（面積5 mm²）と対極（面積5 mm²）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1 mm²）を一組とした87組の電極チップをウェハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウェハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10 mm×6 mmとなる。

【0099】

つづいて、全面に1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピノコートして結合層を形成した。その後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピノコートして、固定化酵素層を形成した。そしてその後、1v/v%のγ-アミノプロピルトリエ

トキシシラン溶液をスピニコートして結合層を形成した。

【0100】

その後、その上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて0.3重量%に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピニコートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。以上により第1の酵素電極を作製した。スピニコートの条件は3000 rpm、30秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルのキシレンヘキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率17%、キシレンヘキサフルオライド含有率83%、粘度20 cps (25°C)）に対し、さらにキシレンヘキサフルオライドを添加し樹脂含有量を0.3重量%に調整したものを用いた。

【0101】

対照として、アクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルを固定化酵素層上にディップコートして制限透過層を形成し、第2の酵素電極を作製した。

【0102】

第1および第2の酵素電極は、それぞれのウェハから4個ずつ取り、評価に供した。なお、制限透過層の平均厚みは、第1の酵素電極は0.2 μm、第2の酵素電極は1.4 μmであった。

第1の酵素電極の制限透過層のプロファイルは以下の通りであった。

平均層厚D: 0.2 μm 表面粗さR: 0.5 nm R/D = 0.0025

各電極をワイヤーボンディングによって電気化学測定装置に接続し、印加後に得られるベースの電流値から、出力の電流値の差をセンサ出力として測定した。印加電位は、参照極に対して作用極に700mVとした。測定中および保存中は各酵素電極を150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に24°Cで浸漬するものとした。

【0103】

第1の酵素電極（スピニコート法）と第2の酵素電極（ディップコート法）を用いて、約300 mg/dlのグルコースを含むバイオラッド（株）社製の定量用尿コントロール異常（ライフォチェック（登録商標））中のグルコースを10回連続し

て測定した。そして、繰り返し再現性を求めた。これらの結果を表4に示す。なお、繰り返し再現性は以下の計算式によって求めた。

【0104】

$$\text{繰り返し再現性 (\%)} = \text{標準偏差} / \text{平均値} \times 100$$

スピンコート法により作製した第1の酵素電極ではすべての電極で2%程度の繰り返し再現性を示したが、ディップコート法で作製した第2の酵素電極の場合、約3%であった。スピンコート法で製作した酵素電極の方が高い測定精度が得られることがわかった。第1の酵素電極は、制限透過膜の表面に適度な表面粗さが付与されているため、汚染物質の付着が抑制されたため、高い繰り返し再現性が得られたものと考えられる。

【0105】

【表4】

表4

第1の酵素電極

センサ4-1	2.2%
センサ4-2	2.1
センサ4-3	1.9
センサ4-4	2.4

第2の酵素電極

センサ5-1	3.3%
センサ5-2	2.8
センサ5-3	3.4
センサ5-4	3.0

【0106】

(実施例8)

日本電気硝子(株)社製の4インチの石英ウェハ(厚さ0.515mm)を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0107】

まず、白金からなる作用極（面積5mm²）と対極（面積5mm²）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1mm²）を一組とした87組の電極チップをウエハ上に製作した。図11はその様子を示すものであり、ウエハ12上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10mm×6mmとなる。

【0108】

つづいて、全面に1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピノートして結合層を形成した。その後、グルコース酸化酵素を含み、かつ1v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5w/v%アルブミン溶液をスピノートして、固定化酵素層を形成した。そしてその後、1v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピノートして結合層を形成した。

【0109】

その後、その上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて0.3重量%に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピノートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。以上により第1の酵素電極を作製した。スピノートの条件は3000rpm、30秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルのキシレンヘキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率17%、キシレンヘキサフルオライド含有率83%、粘度20cps(25°C)）に対し、さらにキシレンヘキサフルオライドを添加し樹脂含有量を0.3重量%に調整したものを用いた。

【0110】

対照として、アクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルを固定化酵素層上にディップコートして制限透過層を形成し、第2の酵素電極を作製した。

【0111】

第1および第2の酵素電極は、それぞれのウエハから4個ずつ取り、評価に供した。なお、制限透過層の平均厚みは、第1の酵素電極は0.2μm、第2の酵素電極は1.4μmであった。

第1の酵素電極の制限透過層のプロファイルは以下の通りであった。

平均層厚D：0.2 μ m 表面粗さR：0.5 nm R/D=0.0025

各電極をワイヤーボンディングによって電気化学測定装置に接続し、印加後に得られるベースの電流値から、出力の電流値の差をセンサ出力として測定した。印加電位は、参照極に対して作用極に700mVとした。測定中および保存中は各酵素電極を150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に24°Cで浸漬するものとした。

【0112】

初めに、第1の酵素電極（スピンドル法）と第2の酵素電極（ディップコート法）の0-2000 mg/dlグルコースに対する電流値を測定して検量線を作成した。そして、これらの電極を緩衝液から取り出して、25°Cおよび40°Cの窒素雰囲気下において30日間乾燥保管した。

つづいて、同濃度のグルコースに対する検量線を作成した。乾燥保管前後の検量線を比較した結果を図15の(a)、(b)および図16の(a)、(b)に示す。図15は第1の酵素電極、図16は第2の酵素電極の検量線をそれぞれ示し、(a)と(b)はそれぞれ乾燥保管前後の検量線である。ただし、図15および図16に示した酵素電極は予め選別を行い、特性の揃った物を評価に用いた。

スピンドル法により作製した第1の酵素電極の検量線は、乾燥保管前後で良く一致し、特性が損なわれることがなかった。しかしながら、ディップコート法で作製した第2の酵素電極の場合、直線性の低下は認められないものの、電流値が著しく増加し、安定性が損なわれることが示された。第1の酵素電極の結果から、制限透過膜の表面に適度な表面粗さが付与されることによって、センサ出力の安定性も確保できることが示された。

【0113】

（実施例9）

日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウェハ（厚さ0.515 mm）を2枚用意し、これらを用いて以下の工程を実施した。

【0114】

まず、白金からなる作用極（面積5 mm²）と対極（面積5 mm²）、銀／塩化

銀からなる参照極（面積 1 mm^2 ）を一組とした 87 組の電極チップをウエハ上に製作した。図 11 はその様子を示すものであり、ウエハ 12 上に多数の電極チップが形成されている。一組に切り分けたとき電極チップサイズは $10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ となる。

【0115】

つづいて、全面に 1 v/v\% の γ -アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピニコートして結合層を形成した。つづいて、 5 w/v\% のパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂溶液をスピニコートしてパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂（ナフイオン）を主成分とするイオン交換樹脂層を形成した。次に、グルコース酸化酵素を含み、かつ 1 v/v\% のグルタルアルデヒドを含む 22.5 w/v\% アルブミン溶液をスピニコートして、固定化酵素層を形成した。そしてその後、 1 v/v\% の γ -アミノプロピルトリエトキシシラン溶液をスピニコートして結合層を形成した。

【0116】

その後、その上に、キシレンヘキサフルオライドを用いて 0.3 重量% に調整したアクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルをスピニコートにより塗布した後、乾燥を行い、制限透過層を形成した。以上により第 1 の酵素電極を作製した。スピニコートの条件は 3000 rpm 、30 秒間とした。塗布液は、ポリアクリル酸 1 H 、 1 H 、 2 H 、 2 H -パーフルオロデシルのキシレンヘキサフルオライド溶液（アクリル酸樹脂含有率 17% 、キシレンヘキサフルオライド含有率 83% 、粘度 20 cps (25°C)）に対し、さらにキシレンヘキサフルオライドを添加し樹脂含有量を 0.3 重量% に調整したもの用いた。

【0117】

対照として、アクリル酸樹脂のフルオロアルコールエステルを固定化酵素層上にディップコートして制限透過層を形成し、第 2 の酵素電極を作製した。

【0118】

第 1 および第 2 の酵素電極は、それぞれのウエハから 3 個ずつ取り、評価に供した。なお、制限透過層の平均厚みは、第 1 の酵素電極は $0.2 \mu\text{m}$ 、第 2 の酵素電極は $1.4 \mu\text{m}$ であった。

第 1 の酵素電極の制限透過層のプロファイルは以下の通りであった。

平均層厚D: 0.2 μ m 表面粗さR: 0.5 nm R/D = 0.0025

各電極をワイヤーボンディングによって電気化学測定装置に接続し、印加後に得られるベースの電流値から、出力の電流値の差をセンサ出力として測定した。印加電位は、参照極に対して作用極に700mVとした。測定中および保存中は各酵素電極を150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に24°Cで浸漬するものとした。

【0119】

第1の酵素電極（スピンドル法）を用いて糖尿病患者の血漿（31サンプル）を測定し、同時に既存の測定装置である臨床検査装置（商品名、日立自動測定装置7050）でも同一条件で測定した。そして得られた個々の成分の値を回帰処理し、相関関係を算出して評価した。また、第2の酵素電極（ディップコート法）を用いて同様に糖尿病患者の実尿を測定した。これらの結果を表5に示す。スピンドル法により作製した酵素電極ではすべての電極で相関係数0.99以上の高い相関が得られたのに対して、ディップコート法で作製した場合、相関係数のばらつきが認められ、いずれも0.92以下であった。スピンドル法で製作されることによって、均一に溝が形成され、グルコースがスムーズに制限透過層を透過し、適度な表面粗さが付与されているため、汚染物質の付着が抑制され、ウエハ面内で作製される個々の酵素電極の性能が均一になると考えられる。また、データには記載されていないが、電極表面に付着した汚染物質が測定後の洗浄時において、完璧に取り除かれていることも測定精度の向上に寄与していると考えられる。

【0120】

以上のように、制限透過層をスピンドル法で製作し表面に溝を形成された酵素電極は、臨床検査用の大型装置と同等の高い測定精度を示すことが明らかになった。

【0121】

【表 5】

表5

第1の酵素電極

センサ9-1	R=0.992
センサ9-2	R=0.995
センサ9-3	R=0.990

第2の酵素電極

センサ10-1	R=0.901
センサ10-2	R=0.922
センサ10-3	R=0.897

【0122】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、制限透過層の表面形状が高度に制御されているため、広範囲の使用条件下において使用でき、長期使用に対する耐久性が良好で、しかも、生産性に優れた酵素電極が提供される。特にウエハプロセスを採用した場合にも所望の性能が安定的に得られる構造の酵素電極が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係る酵素電極の断面図である。

【図 2】

本発明に係る酵素電極の断面図である。

【図 3】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 4】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図5】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図6】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図7】

スピンドルコート法により作製された制限透過層のAFM像である。

【図8】

図7のAFM像に対応する表面粗さヒストグラムである。

【図9】

スピンドルコート法により作製された制限透過層のAFM像である。

【図10】

従来の酵素電極の断面図である。

【図11】

ウエハ上に電極部を形成した段階の状態を示す図である。

【図12】

本発明に係る酵素電極の概略図である。

【図13】

チップ単位で酵素電極を作製する製造方法の工程を示す図である。

【図14】

チップ単位で酵素電極を作製する製造方法の工程を示す図である。

【図15】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図16】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

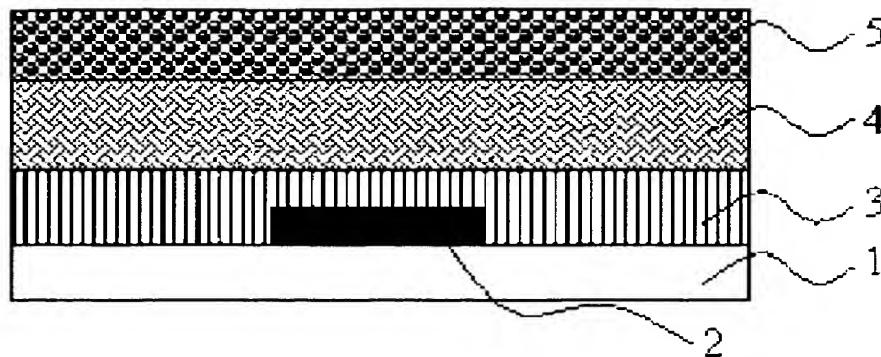
【符号の説明】

- 1 絶縁基板
- 2 電極
- 3 結合層

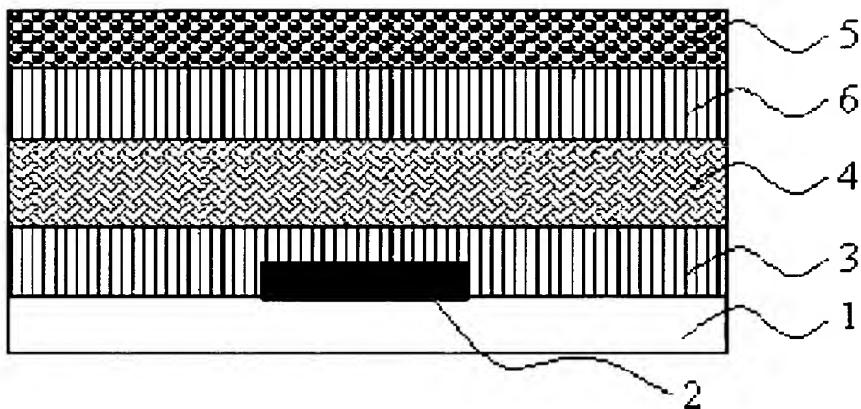
- 4 固定化酵素層
- 5 制限透過層
- 6 密着層
- 12 ウエハ
- 15 溫度センサ
- 17 作用極
- 18 対極
- 19 参照極
- 30 基板
- 31 電極
- 32 固定化酵素層
- 33 接着層
- 34 高分子層
- 35 制限透過層
- 36 接着層
- 37 保護層

【書類名】 図面

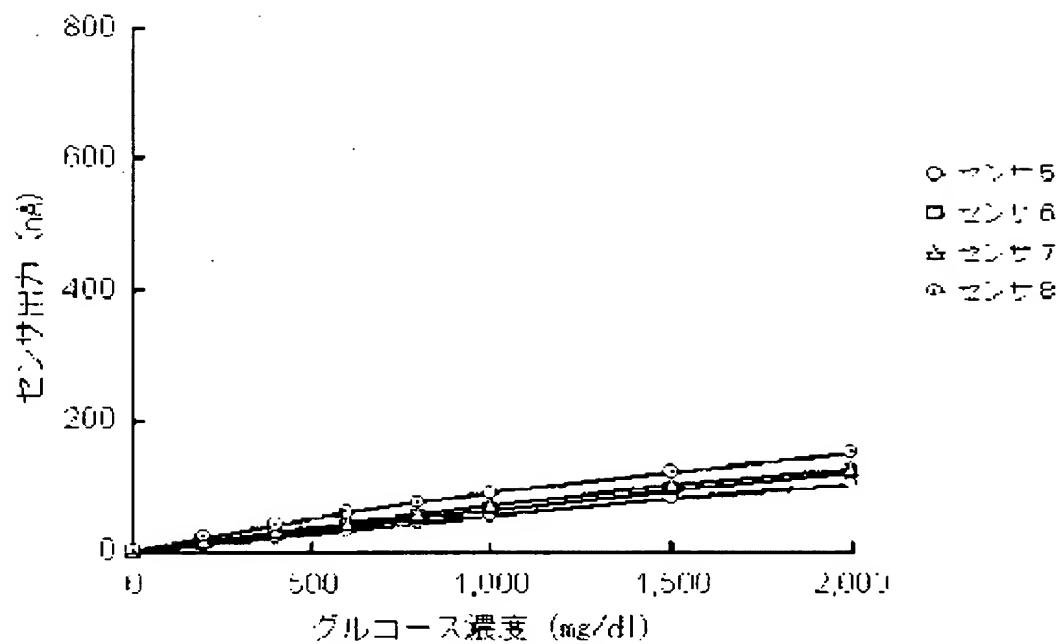
【図1】



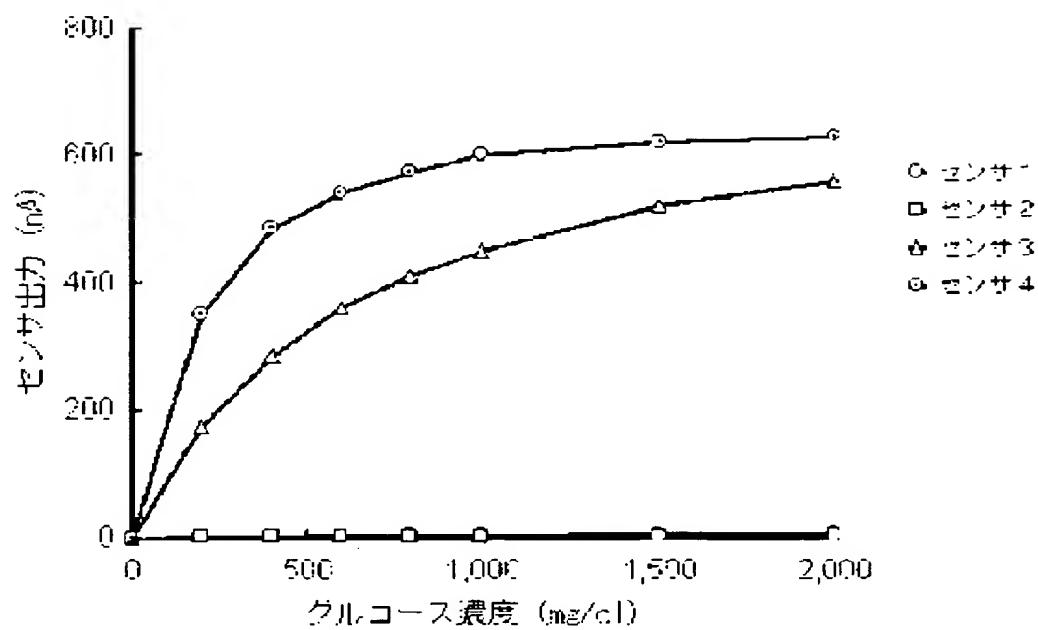
【図2】



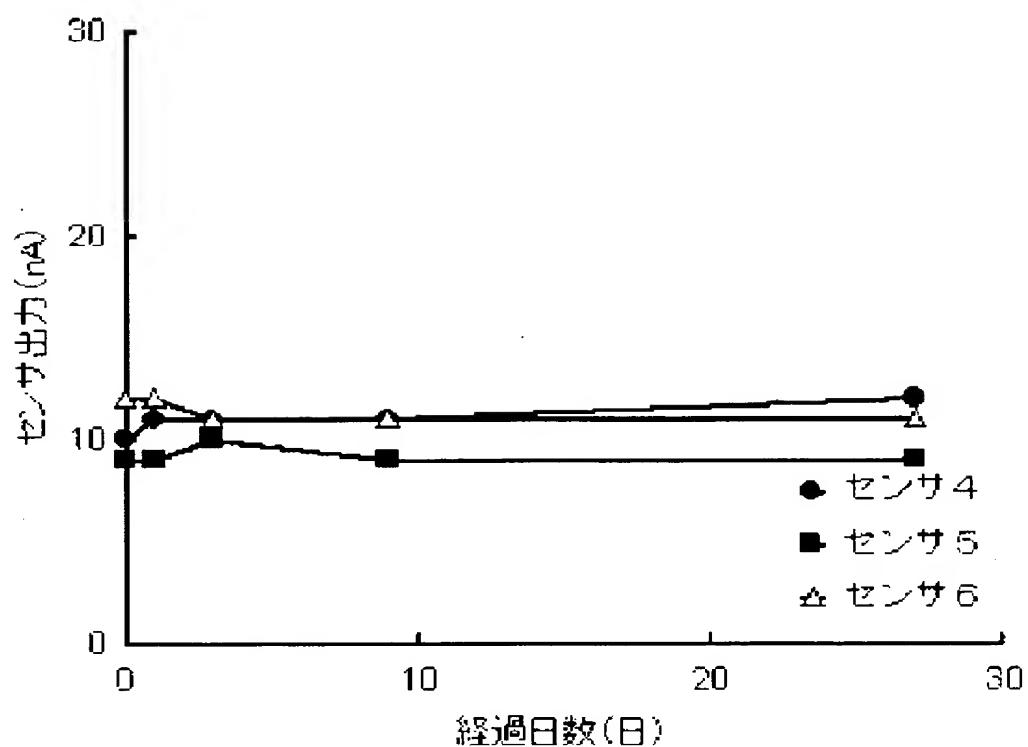
【図3】



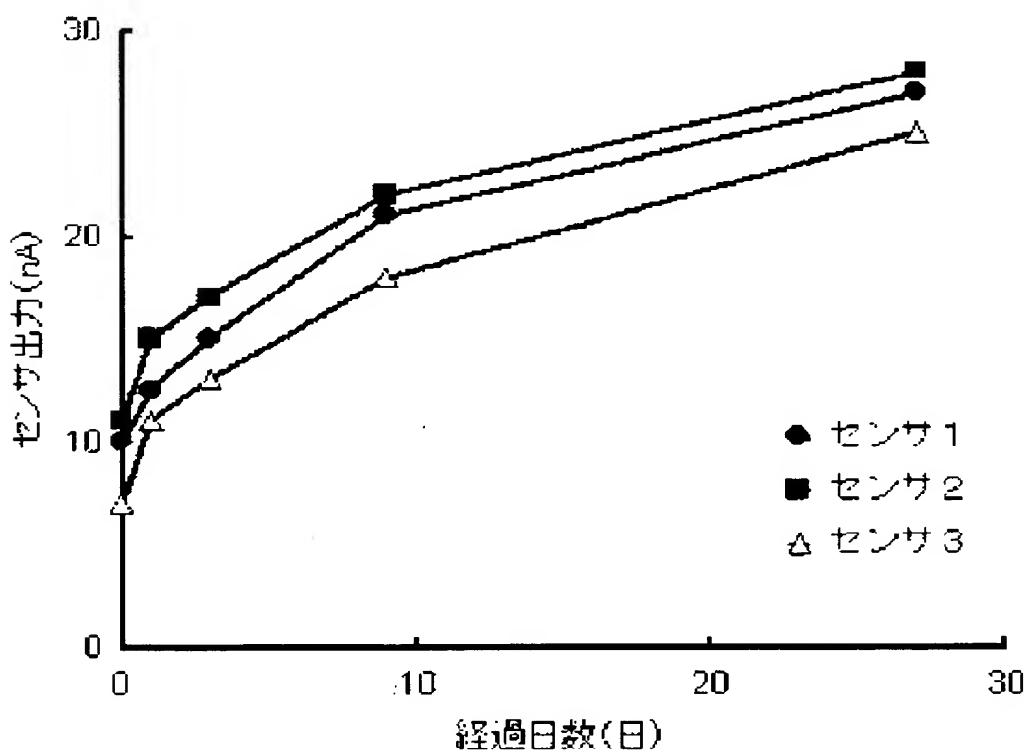
【図4】



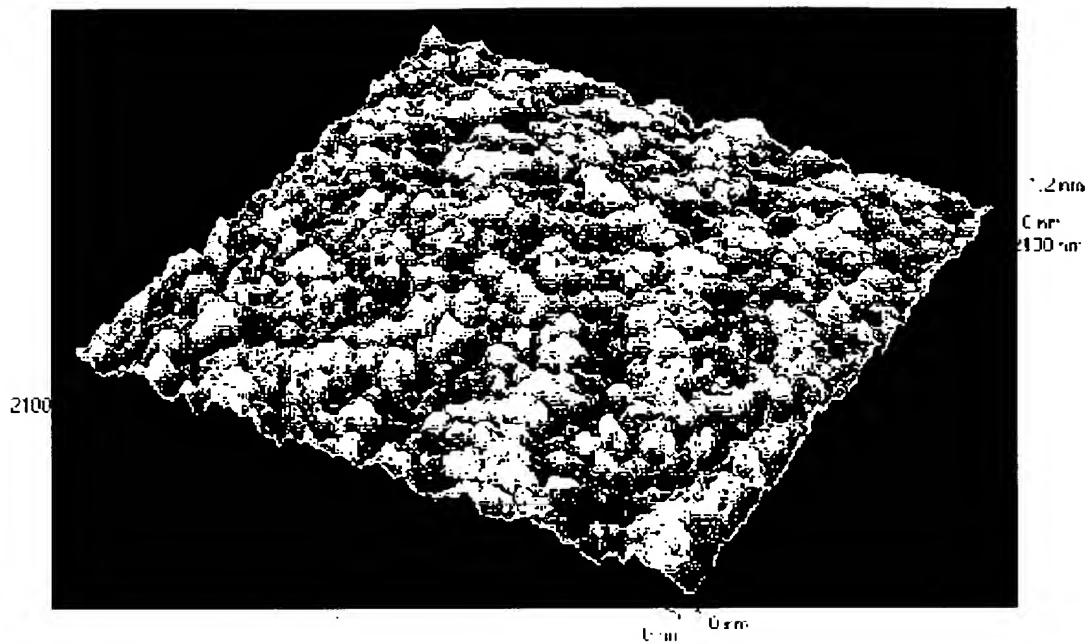
【図5】



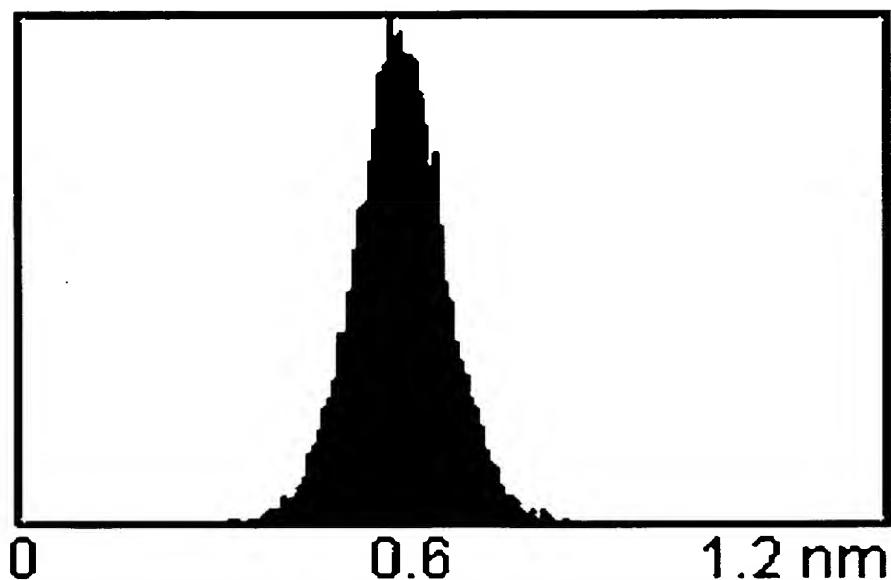
【図6】



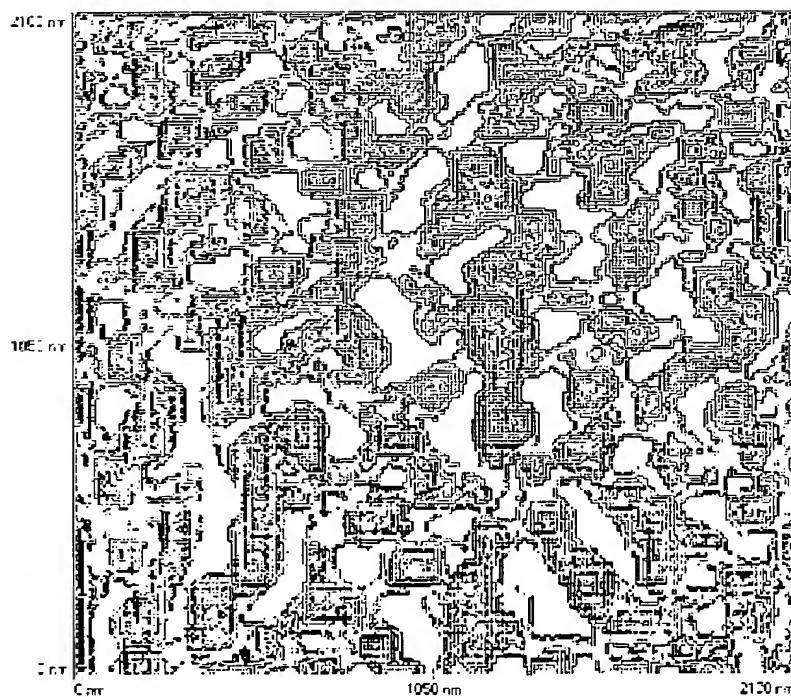
【図7】



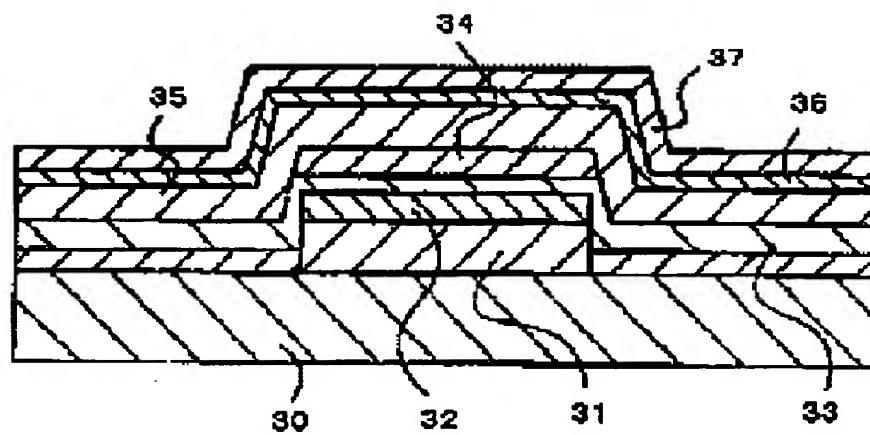
【図8】



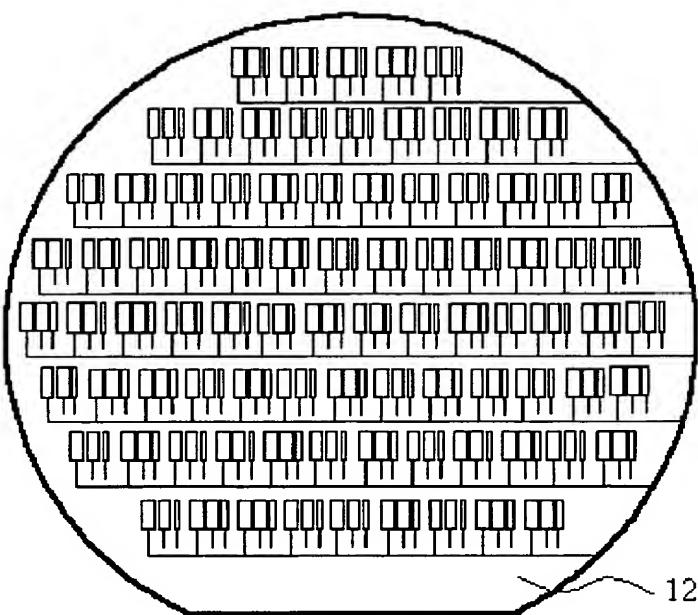
【図9】



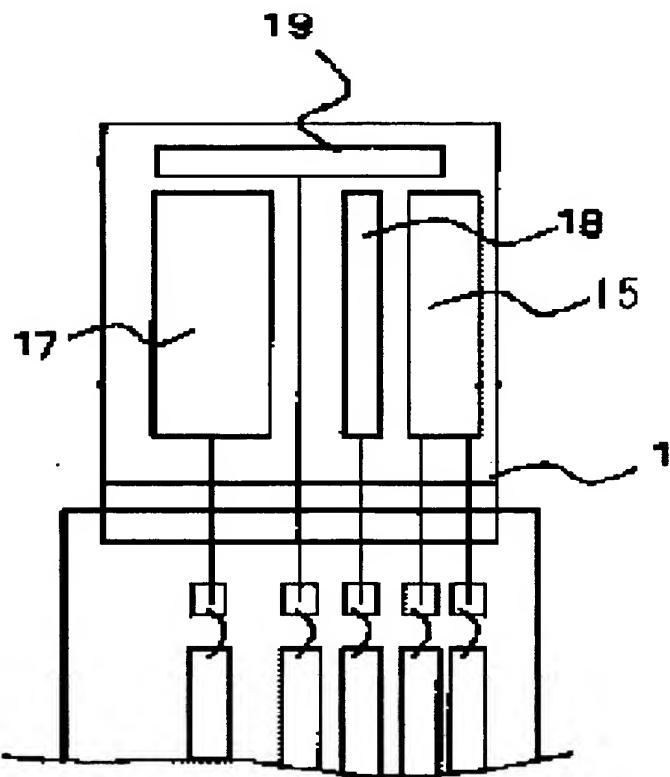
【図10】



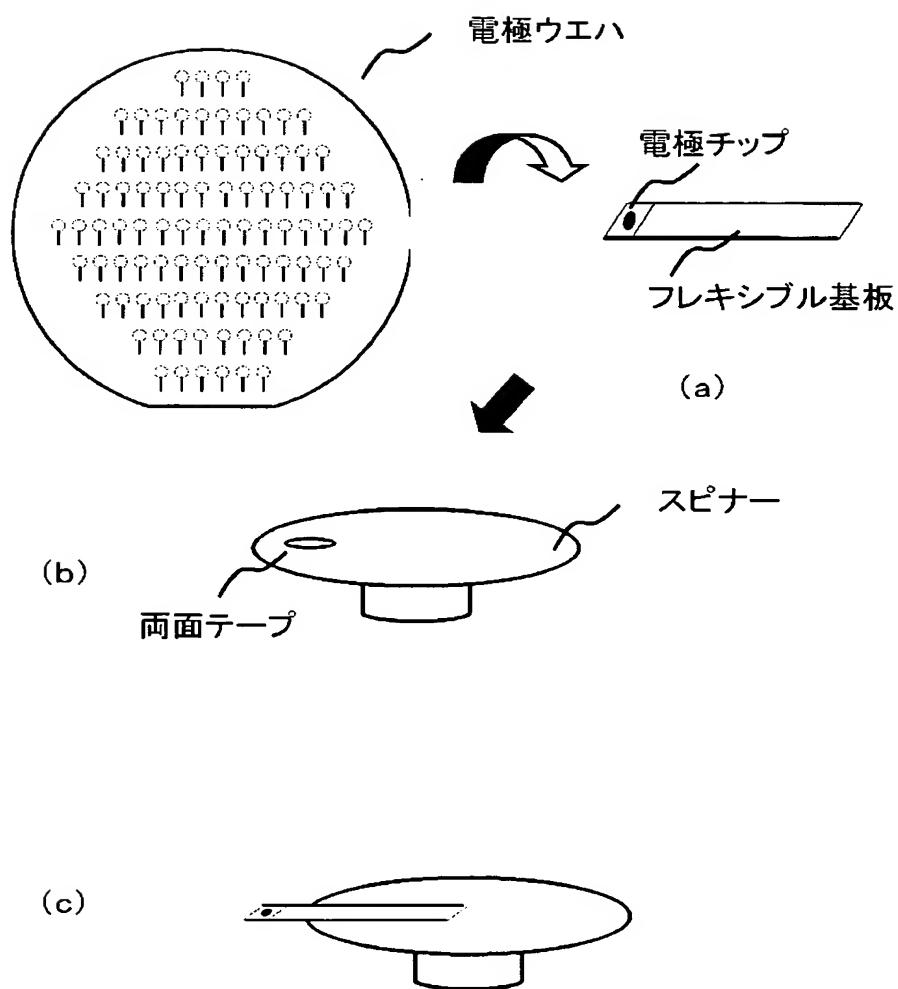
【図11】



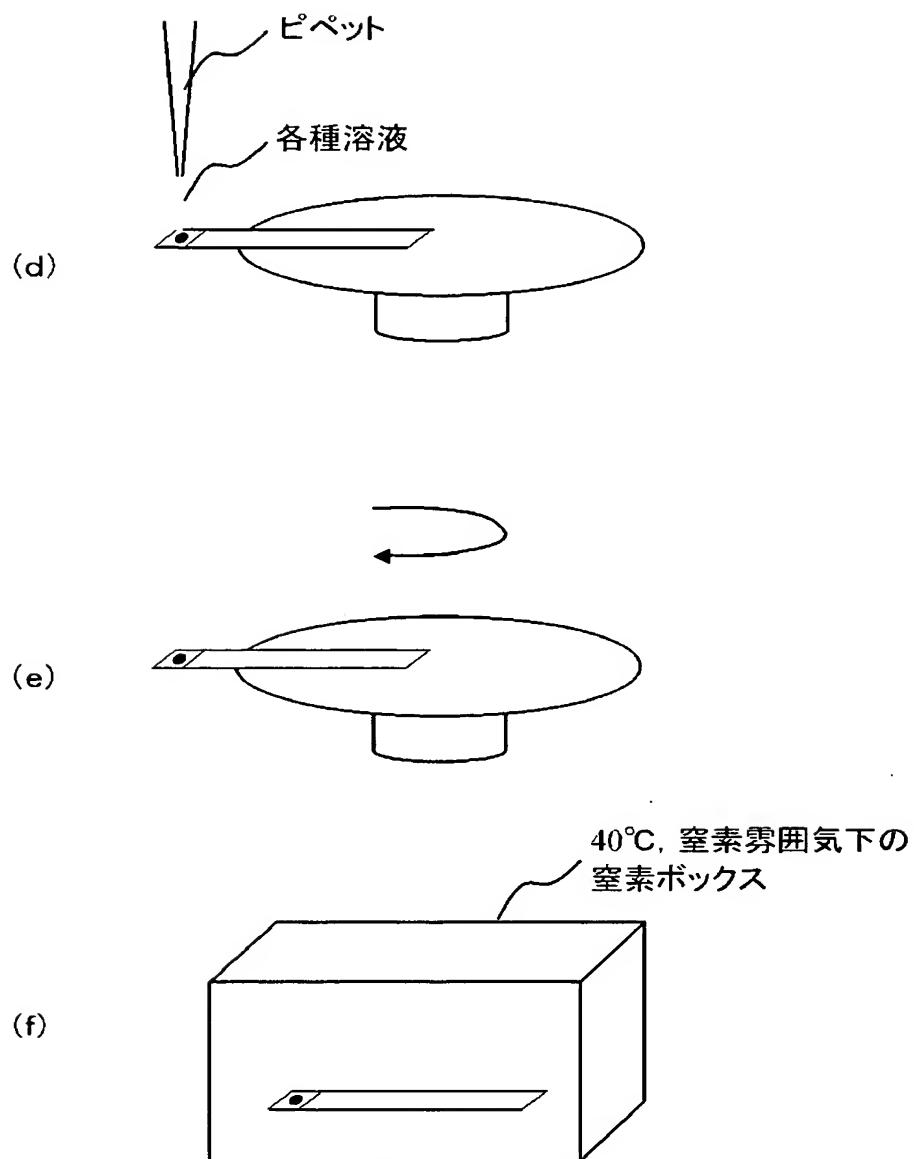
【図12】



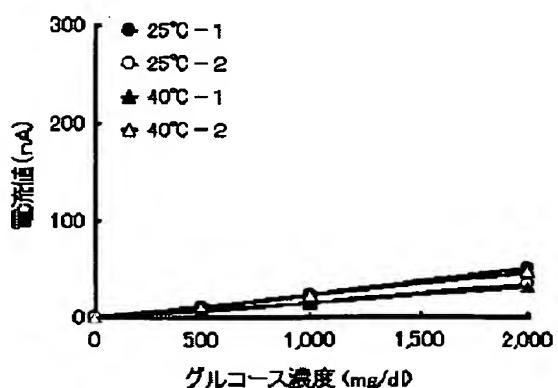
【図13】



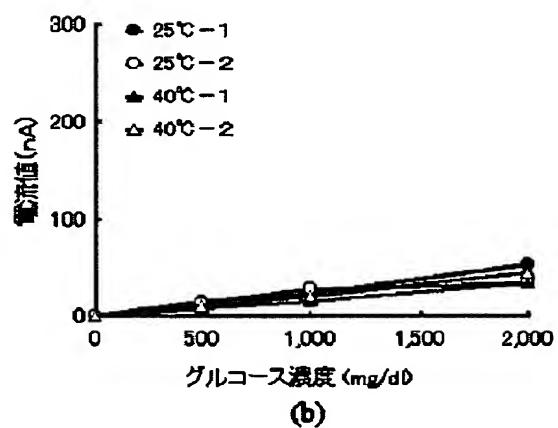
【図14】



【図15】

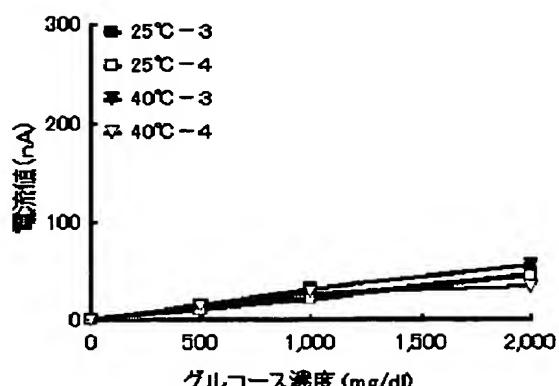


(a)

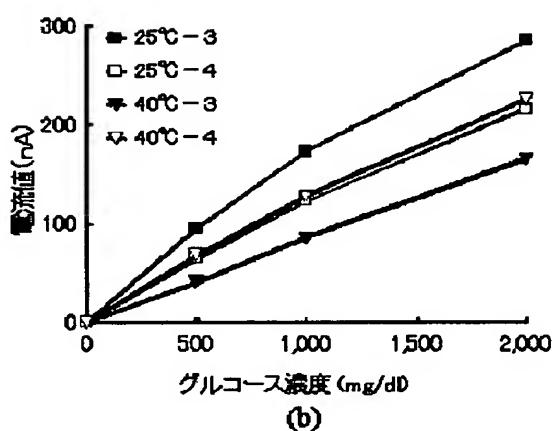


(b)

【図16】



(a)



(b)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 広範囲の使用条件下において使用でき、長期使用に対する耐久性が良好で、しかも、生産性に優れた酵素電極を提供する。特に大量生産プロセスを採用した場合にも所望の性能が安定的に得られる構造の酵素電極を提供する。

【解決手段】 絶縁基板1上に作用極として機能する電極2を設け、この上にγ-アミノプロピルトリエトキシシランから主としてなる結合層3、固定化酵素層4およびポリカルボン酸樹脂のフルオロアルコールエステルを主成分とする制限透過層5を順次形成する。制限透過層5の表面に多数の溝を設ける。制限透過層5の平均厚みを0.01~1μmとし、制限透過層5の表面粗さを制限透過層5の平均厚みの0.0001倍以上1倍以下とする。

【選択図】 図1

特願 2001-237180

出願人履歴情報

識別番号 [000004237]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区芝五丁目7番1号

氏 名 日本電気株式会社